

⑫ 公開特許公報(A) 平1-104075

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成1年(1989)4月21日

C 07 D 475/14
G 01 N 27/308829-4C
E-7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 フラビン誘導体およびその製造方法

⑯ 特 願 昭62-262256

⑰ 出 願 昭62(1987)10月16日

特許法第30条第1項適用 昭和62年9月25日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第55回秋季年会講演予稿集Ⅱ」において発表

⑱ 発 明 者 上 山 智 嗣 兵庫県尼崎市塚口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社
中央研究所内⑲ 発 明 者 磯 田 悟 兵庫県尼崎市塚口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社
中央研究所内

⑳ 出 願 人 三菱電機株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号

㉑ 代 理 人 井理士 大岩 増雄 外2名

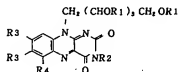
明 經 書

1. 発明の名称

フラビン誘導体およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

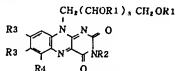
(1) 一般式



(I)

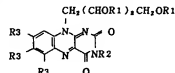
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子またはアシル基を、R₄は水素原子または炭素数1〜4個の低級アルキル基を、R₅は水素原子または炭素数1〜4個の低級アルキル基を、R₆はナオシアナト基またはメルカプト基を表わす。)

(2) 一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1〜4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

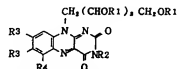
で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアン配塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解する、一般式



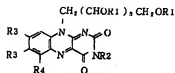
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1〜4個の低級アルキル基を、R₄はナオシアナト基を表わす。)

で示される6チオシアナトフラビン誘導体の製造方法。

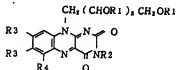
(3) 一般式



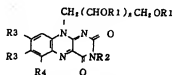
(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はチオシアナト基を表わす。)で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式

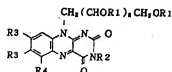


この発明のフラビン誘導体は、一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はチオシアナト基またはメルカプト基を表わす。)で示されるものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はメルカプト基を表わす)で示される6-メルカプトフラビン誘導体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、新規なフラビン誘導体およびその製造方法に関するものである。

(従来の技術)

従来、フラビン誘導体としては、例えばリボフラビンやルミフラビンが市販されていた。

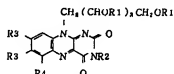
(発明が解決しようとする問題点)

上記リボフラビンやルミフラビンを、例えばバクトクロームCやルブレドキシン等の電子伝達タンパク質を還元するための電極の修飾剤として用いることは困難であつた。

この発明は、従来に代わる新規なフラビン誘導体およびその製造方法を得ることを目的とする。

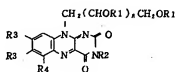
(問題点を解決するための手段)

化合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して、一般式



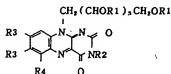
(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はチオシアナト基を表わす。)で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得るものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



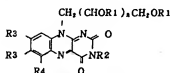
(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基を表わす。)

で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカプト基を表わす)

シアナト基である6-チオシアナトフラビン誘導体は、文献上既知の6-アミノフラビン誘導体(バイオケミストリイ、19,2537(1980)等)を15～40%の硫酸もしくは塩酸酸性水溶液中、1.5～5倍モルの亜硝酸ナトリウムと作用させ、6-ジアゾフラビン誘導体を生じさせた後、これを単離することなくチオシアン酸カリウムと作用させることにより合成出来る。

また、6-チオシアナトフラビン誘導体を水溶液中、還元剤(例えばヒドロサルファイナトリウム、水酸化ホウ素ナトリウム、ジチオスレイトールなど)と作用させるか、または光照射下にEDTAと作用させることにより目的とする一般式(I)中、R₁がメルカプト基である6-メルカプトフラビン誘導体が合成出来る。6-チオシアナトフラビン誘導体、および6-メルカプトフラビン誘導体の両れも通常の再結晶法または分子ふるい、シリカゲルカラム、樹脂カラム等の精製法により単離することが可能である。

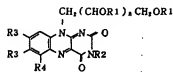
この発明のフラビン誘導体の製造方法の実施

で示される6-メルカプトフラビン誘導体を得るものである。

(実施例)

以下、この発明の実施例について述べるが、これに限定されない。

この発明の新規なフラビン誘導体は一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基またはメルカプト基を表わす)

で示される。この発明の新規なフラビン誘導体としては、例えば6チオシアナト-2',3',4',5'-テトラセチルリボフラビンおよび6メルカプト-2',3',4',5'-テトラセチルリボフラビンなどがある。

一般式(I)で示されるフラビン誘導体中、R₁がテ

例の6-チオシアナト-2',3',4',5'-テトラセチルリボフラビンの合成について述べる。即ち、6-アミノ-2',3',4',5'-テトラセチルリボフラビン1.00g(1.79mmole)を、濃硫酸10mlおよび氷水30mlの0℃氷液中に懸濁する。97%亜硝酸ナトリウム19.65mg(2.68mmole)を0℃で添加後、15分間同温で攪拌する。尿素19.65mgを0℃で添加し、過剰の亜硝酸ナトリウムを分解して、さらに15分間攪拌する。充分に分解させた後、飽和チオシアン酸カリウム水溶液0.85mlを0℃で加え、窒素ガスの発生が止むまで(約30分)攪拌する。

25%アンモニア水30mlをを内温15℃以下で、最終液性がpH2になるようにする。反応液をクロロホルムの50mlで3回、合計150mlで抽出を行い、合わせたクロロホルム溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。減圧下溶媒を留去させた後、残渣をシリカゲルカラム(溶出液:アセトン-ベンゼン=1:5)に付し、目的のフラクションを合わせ、減圧下溶媒を留去する。残留物をクロロ

ホルムとヘキサンの混合物より再結晶することにより、目的の6-チオシアト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの黄色結晶367mgが得られる。収率は、34.1%である。

なお、上記化合物が以下に示す測定結果により、目的化合物であることを同定した。

融点 138°-142°C

元素分析(%) 計測値 C, 51.92, H, 4.52, N, 11.62

実測値 C, 51.65, H, 4.52, N, 11.52

赤外線吸収スペクトル IR (KBr, cm^{-1}) 3470, 2150, 1740, 1580, 1535, 1215

核磁気共鳴 NMR (CDCl_3 , δ ppm) 1.82, 2.09, 2.21, 2.31, 2.66, 2.76 (each 3H, s), 4.25, 4.44 (each 1H, d), 5.41 (4H, broad), 5.60 (1H, broad), 7.77, 8.61 (each 1H, S)

次に、この発明のフラビン誘導体の製造方法の一実施例の6-メルカプト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの合成について述べる。即ち、上記のようにして得た6-チオシアト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの

0.05M りん酸2水素カリウム-りん酸2ナトリウム緩衝液(pH7.0)を用いた 5.10×10^{-3} M濃度の溶液を調整した後、安定剤としてEDTA2ナトリウムを 1.0×10^{-4} Mとなるように加え試料溶液とする。

これに、ジチオスレイトールを 8.0×10^{-4} Mとなるように加える。室温下、2時間攪拌すると目的の6-メルカプト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンが生じる。第1図に可視紫外吸収スペクトル図を示す。

次に6-メルカプト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの製造の他の方法について説明する。

EDTA2ナトリウムを加えない以外は前述の実施例と同様に試料溶液を調整した後、窒素雰囲気下、ハイドロサルファイトナトリウムを 8.0×10^{-4} Mになるように加え室温で1時間30分攪拌する。本操作により生じた6-メルカプト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの紫外吸収スペクトルは上記のそれと一致した。

なお、上記のようにして得られたフラビン誘導

体を用いて下記修飾法により例えば安定なフラビン修飾電極を製造することができる。

上記のように合成したフラビン誘導体を例えば $0.1 \text{ mg/l} \sim 100 \text{ mg/l}$ の濃度で水または緩衝液に溶解し、この溶液中に、水または濃い酸または有機溶剤等で洗浄した金、銀、白金などの金属、酸化スズなどの金属酸化物、シリコンや炭素などの半導体、等の導電性基板を0.1秒から1時間浸せきすることによって、フラビン修飾電極を得ることができる。

下記に、例えば金蒸着電極上へのチオシアトテトラアセチルリボフラビンの修飾について示す。即ち、第2図の金電極の正面図に示すように金を蒸着したガラス基板を蒸留水で洗浄した後、硝酸液中に10分間浸せきして洗浄金電極とする。また、6-チオシアト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンをリン酸緩衝液(pH7.0, 20mM)中に 10 mg/l の濃度に溶解する。この水溶液に上述の洗浄金電極を10分間浸せきした後、水洗して、安定なフラビン修飾電極を得た。なお、図におい

て、(A)はガラス基板、(B)は金蒸着膜、(A)は50mm、(B)は3mm、(C)は10mm、(D)は2mmを示す。

サイクリックボルタンメトリによる修飾電極の安定性試験

リン酸緩衝液(pH7.0, 20mM)中に過塩素酸ナトリウムを100mMの濃度に溶解し、アルゴン通気により脱酸素し、これを電解液として上記修飾電極のサイクリックボルタンメトリを(0 ~ -600mV vs. Ag/AgCl, 掃引速度 50mV/s)測定し、このときのサイクリによる還元ピークの高さの変化を示す特性図を第3図に示す。3サイクル以降、還元ピークの高さは、ほとんど変化せず、6-チオシアト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンが安定に金表面に吸着していることを示すものである。なお、図において、縦軸はピーク電流値(μA)を横軸はサイクル(回)を示す。

チクロロームcの還元

チクロロームcを $330 \mu\text{M}$ の濃度になるように上記電解液に溶解し、この溶液中で上記フラビン修飾電極を用いてサイクリックボルタンメトリを

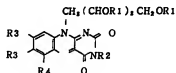
行つた結果をチトクロームcを含まない場合と比較して第4図のサイクリックポルタログラムに示す。酸化ピークは認められず、大きく還元電極が流れるようになることから、この修飾電極を用いることによつて、チトクロームcを還元はできるが酸化はできないようにすること、すなわち、電極からチトクロームcへの一方向の電子移動のみ起こすこと、が可能になることがわかる。

図において、(a)はチトクロム c を含まない時のサイクリックボルタモグラム、(b)はチトクロム c を含むサイクリックボルタモグラムを示す。又、縦軸は電流 (μA) を横軸は $Ag/AgCl$ 電極に対する電圧 (mV) を示す。

なお、電子伝達タンパク質として、チトクローム c の代りに、ルミフラビンを用いた場合も同様である。

〔發明の效果〕

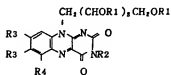
以上説明したとおり、この発明は
一般式



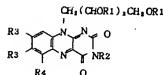
(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はテオシアナト基を表わす。)

で示される 6 チオシアナトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

又、この発明の別の発明は
一般式



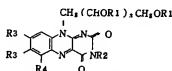
(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2, R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はチオシアナト基またはメルカプト基を
表わす。)

で示される新規なフラビン誘導体である。

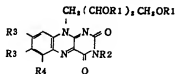
又この発明の別の発明は



(式中、 R_1 は水素原子またはアルキル基を、 R_2, R_3 は水素原子または炭素数1~4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)

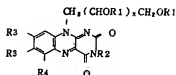
で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2, R_3 は水素原子または炭素数1~4個の低級アルキル基を、 R_4 はテオシアナト基を表わす。)

で示される 6-チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解して一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアシル基を、 R_2, R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はメルカプト基を表わす)

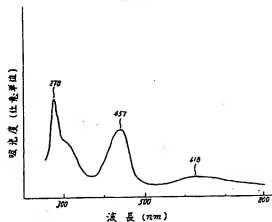
で示される6-メルカプトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

4. 図面の簡単な説明

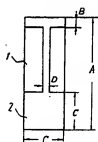
第1図はこの発明の一実施例の6-メルカプト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの可視紫外吸収スペクトル図、第2図は金電極の正面図、第3図はこの発明の一実施例の6-チオシチアト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンによる金電極の修飾に得られた修飾電極のサイクル(回)による還元ピークの高さ(μA)変化を示す特性図、第4図は上記修飾電極を用いたサイクリックボルタモグラムを示す。

代理人 大 岩 増 雄

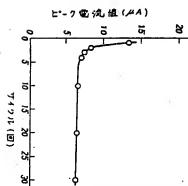
第1図



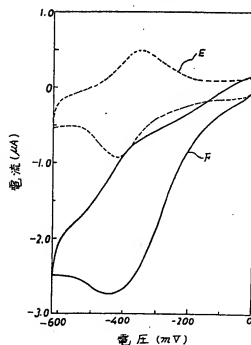
第2図



第3図

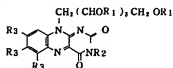


第4図



Copied from 10522210 on 01/12/2007

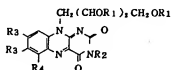
合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解する、一般式



(式中、 R_1 は水素原子またはアルキル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はナオシアナト基を表わす。)

で示される6チオシアナトフラビン誘導体の製造方法。

(a)一般式

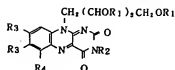


(式中、 R_1 は水素原子またはアルキル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

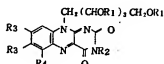
方法。

合物とした後、チオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステル加水分解して一般式



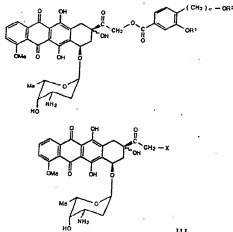
(式中、 R_1 は水素原子またはアルキル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はチオシアナト基を表わす。)

で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式



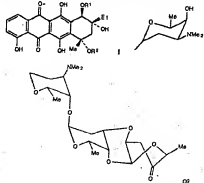
(式中、 R_1 は水素原子またはアルキル基を、 R_2 、 R_3 は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、 R_4 はメルカプト基を表わす)

で示される6-メルカプトフラビン誘導体の製造

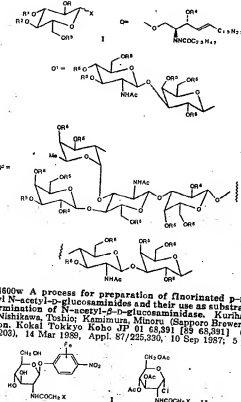
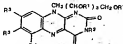


mycin.

: 174598b Preparation of anthracycline derivatives as statics. Berscheid, Hans Gerd; Fehlbauer, Hans Wolfram; A-G.) Eur. Pat. Appl. EP 311,002 (Cl. C07H15/252), 12 1989, DE Appl. 3,733,885, 07 Oct 1987; 9 pp. The title

[illegible]

111: 174800w A process for preparation of fluorinated p-nitrophenyl N-acetyl-D-glucosaminides and their use as substrates for determination of N-acetyl-D-glucosaminidase. Kurihara, Toshio; Nishikawa, Toshio; Kamimura, Minoru (Sapporo Breweries, Ltd.) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 68,391 10 Sep 68,391 (Cl. C07H15/203), 14 Mar 1989, Appl. 87/225,330, 10 Sep 1987; 5 pp.

[illegible][illegible]

111: 174
arabonats
Nakamura
National
C07C59/1
Alkalis me
EtOH, Pr
with O, co
Thus, O w
10-30 mix
of methan
cooling, m
111: 174
system a
Yuji; Y
Ogawa, T
52,794 [8
87/134,071

R¹ = SQ; useful for glycosidation (Ac) with 3 = Cl; R¹ = SAc, R¹ = 2.13 mmol R¹ = CO₂Na, 1,2-*O*-tetra (1:1) was a 88.65% I (which was NaOH in CO₂Na, R² neuroaxis. 111: 1746 for induc Tomoya; Research) C08B37/00

Oligogalact-
= alkyl, pre
for inducing
glycosidatio
CH₂Ph) (IV
= H, n = 0
= silyl, R¹ :
in the pres
gave 75.70%
which was
R² = CH₂O
with (COCl
bath gave a
silyl, n = 8)
NaHPO₄ in
R² = allyl,
MeOH quar
VI).

Copied from 10522210 on 01/12/2007
 BEST AVAILABLE COPY